

**Vergleichende Beurteilung
unterschiedlicher Nachweistestsätze
des antinukleären Faktors
im Serum**

Dissertation

vorgelegt von
Christoph Kleine
—

1979
—

Düsseldorf 1978
—

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinik A,
der Universität Düsseldorf

Direktor : Prof. Dr. med. W. Schneider

VERGLEICHENDE BEURTEILUNG UNTERSCHIEDLICHER NACHWEIS-
TESTSÄTZE DES ANTINUKLEÄREN FAKTORS IM SERUM

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Kleine

1978

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.Reinauer

Referent

gez.: Prof.Dr.Kindler

Korreferent

gez.: Priv.-Doz.Dr.Trobisch



Inhalt :

Seite

I. Einleitung	1
1. Vorkommen antinukleärer Faktoren	2
2. Charakteristika der ANuF	12
3. Differenzierung der Kernantigene	12
II. Untersuchungsmaterial	14
1. ANuF-positive Patientenseren	14
2. Kontrollseren	21
III. Methodik	22
1. Sensibilität	22
2. Spezifität	23
3. Verfügbarkeit	23
4. Praktikabilität	24
5. Antigen	27
a) Hühner-Erythrozyten-Kerne	27
b) baby-hamster-kidney-Zellen	28
6. Konjugat	29
7. optisches System	29
8. Testdurchführung	33
9. Interpretation der Titerstufen	37
10. Probandensera	37
11. Kontrollen	38
12. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	39
IV. Ergebnisse	41
V. Diskussion	45
1. zur Methode	46
a) Versuchsdurchführung	46
b) Standardisierung	47
2. zu den Ergebnissen	48
a) Spezifität	49
b) Sensibilität	49
3. Schlußfolgerung	51
VI. Zusammenfassung	52
VII. Literatur	53

I. EINLEITUNG

Bei den antinukleären Serumfaktoren (ANuF) handelt es sich um Immunglobuline verschiedener Klassen, die spezifisch gegen multiple Kernantigene des eigenen Organismus gerichtet sein können. Man wird also das Auftreten der ANuF als autoaggressiven Mechanismus auffassen müssen, dessen Nachweis besonders im Zusammenhang mit Kollagenosen und verwandten Erkrankungen Bedeutung gewinnt. Für den Nachweis dieser ANuF sind zahlreiche Methoden eingeführt. So kann man sich biochemische Eigenschaften der Immunglobuline wie Präzipitation bzw. Agglutination oder Komplementbindung als Indikatorreaktionen zunutze machen oder auch auf eine radiologische Bestimmung zurückgreifen.

Seitdem jedoch der immunfluoreszenzoptische Nachweis antinukleärer Serumfaktoren durch die Arbeiten von Friou (1962, 1967) weite Verbreitung fand, hat dieses Verfahren auch als screening-Test in die Routine zahlreicher Laboratorien Eingang gefunden. Dabei steht für die Durchführung des Tests eine große Anzahl antigener Substrate zur Verfügung, wobei sich vor allem Hühner-Erythrocyten-Kerne (HEK) nach den Untersuchungen von Ten Veen, Feltkamp und Kruffy (1963, 1969) wegen ihrer hohen Sensibilität und speziell unter Gesichtspunkten der praktischen Durchführbarkeit bewährt haben.

In der vorliegenden Studie soll nun die Frage geklärt werden, ob bei Verwendung eines neuartigen kommerziell erhältlichen Antigen-Materials - nämlich baby-hamster-kidney-Zellen (BHK) -, das auf Grund seiner gebrauchsfertigen Präparation eine weitere Rationalisierung der Labor-Arbeit verspricht, ähnliche oder abweichende Ergebnisse im Vergleich zur Untersuchung mit HEK zu erwarten sind.

1. Vorkommen antinukleärer Faktoren

Tabelle 1) zeigt die grundsätzlichen Möglichkeiten für das Vorhandensein antinukleärer Faktoren, Tab. 2) prozentual die Häufigkeit bei einzelnen Krankheitsbildern (nach Harpey 1974). Ergänzend dazu dokumentieren die Tab. 3)-7) die Ergebnisse anderer Autoren mit unterschiedlichen Nachweismethoden (indirekte Immunfluoreszenz, Komplement-Bindungs-Reaktion, Radioimmunoassay, Hämagglutination) bezüglich des ANuF-Nachweises bei verschiedenen Erkrankungen. Dabei ist das signifikant häufigere Auftreten der ANuF - bis zu 12 % - bei älteren (>60 J.) gesunden Personen bemerkenswert, wobei sich bei weiblichen Probanden ein positiver ANuF-Nachweis in bis zu 25 % der Fälle führen läßt (Svec 1967), in bestimmten Kollektiven sogar in einem noch höheren Prozentsatz (Cammarata 1967). Aus diesem Grunde wurden in dieser Untersuchung zur Kontrolle auch lediglich Personen bis zum Alter von sechzig Jahren herangezogen. Zunehmende Beachtung gewinnt auch die Induktion eines Pseudo-L.e. durch zahlreiche Medikamente (s. auch Tab. 4). In Tab. 8) und 9) (nach Cohnen 1976) sind diejenigen Medikamente aufgeführt, bei denen nach länger-dauernder Medikation die Entwicklung eines solchen Krankheitsbildes mit ANuF beobachtet wurde.

Vorkommen des ANuF :

1. LED / SLE
2. Pseudo LE - medikamenteninduziert
3. Rheumatoide Arthritis
4. Rheumatischer Formenkreis (Felty-, Sjögren-, Raynaud - Syndrom)
5. Systemerkrankungen wie Sklerodermie
6. Nichtrheumatische Erkrankungen : chronisch - aggressive Hepatitis

Tab.1 : Grundsätzliche Möglichkeiten für das Auftreten antinukleärer Faktoren

Verteilung des ANuF :

(n.: J.P.Harpey, Ann.Allerg. 33, 257, 1974)

normale Kontrollpersonen	4 %
Patienten über 60 Jahre	10 - 12 %
SLE	> 90%
rheumatoide Arthritis - ohne D- Penicillamin - Therapie	27 - 25 %
aktive Tuberkulose	3,9 %
aktive Tuberkulose + INH	25,5 %
Procainamidtherapie (3 - 6 Monate)	50 - 60 %
mit klinischer Symptomatik	10 - 12 %
Induktion eines LED durch Medikamente	3 - 12 %

Tab.2 : Prozentuale Häufigkeit antinukleärer Faktoren bei einzelnen Krankheitsbildern(nach Harpey, 1974)

Autor	Sklerodermie	ANuF	AMiF	Sonstiges
Rosenthal (1976)	25	15	0	
Ritchie (1967)	21	16	0	Titel $\geq 1:32$
Helmke (1975)	7	3 $\rightarrow$ 6	0	Änderung unter D- Penicillamin
Husain (1974)	2	2	0	Titel $\geq 1:10$
Nolph (1976)	40	1	-	

Tab.3 : Ergebnisse verschiedener Autoren bezüglich des ANuF-Nachweises bei Sklerodermie
AMiF = Antimitochondrialer Faktor

Autor	Med. - Induz. LED	ANuF	AMIF	Sonstiges
Alarcon - Segovia (1969)	50 50	45 50	0 0	Hydralazin Procainamid
Blomgren (1972)	44	44	0	Procainamid
Dorfman (1972)	34	34	0	Hydantoin
Miyawaki (1974)	12	7	0	Procainamid
Hahn (1972)	12	12	0	Hydralazin
Perry (1970)	22	22	0	Hydralazin
Howard (1973)	1	1	0	Clofibrat
Alarcon- Segovia (1973)	(15) (9) (7)	15 9 7	- - -	Chlorpromazin Isoniazid Antikonvulsiva
Whittingham (1972)	24	24	0	Procainamid
Beernink (1973)	48	11	0	Antikonvulsiva
Bartholomew (1974)	43	43	0	Procainamid

Tab.4 : Ergebnisse verschiedener Autoren bezüglich des ANuF-Nachweises bei medikamenteninduziertem L.e.d.
AMIF = Antimitochondrialer Faktor

Autor	SLE	ANuF	AMiF	Sonstiges
Dubois (1966)	520	510	0	AK gegen native DNS SLE
Dorsch (1969)	76	76	0	nach Verdünnung ANuF neg.
Miyawaki (1974)	41 12	20 7	0 0	a) SLE b) Procainamid Titer $\geq 1:8$
Ritchie (1967)	55	53	0	Titer $\geq 1:32$
Hughes (1974)	38	36	0	Anti - DNS pos.
Bartholomew (1974)	121	116	0	Titer $\geq 1:8$

Tab.5 : Ergebnisse verschiedener Autoren bezüglich des ANuF-Nachweises bei L.e.d.

SLE = L.e.d. = Lupus erythematodes disseminatus

AMiF = Antimitochondrialer Faktor

Autor	RA	ANuF	AMiF	Sonstiges
Dorsch (1969)	34	34	0	bei verdünnten Seren ANuF : neg.
Miyawaki (1974)	17	1	0	
Ritchie (1967)	184 49	180 37	0 0	nur 32 % mit Titer $\geq 1:16$ juvenile RA, 22 % pos. mit Titer $\geq 1:32$
Fischer (1965)	21	4	0	
Heimke (1975)	72	7 $\rightarrow$ 33 (seropos.) 3 $\rightarrow$ 8 (seroneg.)	0	57 seropos., 15 seroneg., Änderung nach D - Penicillamin (Nephropathie)
Bartholomew (1974)	44	13	0	
Nolpn (1976)	64	0	-	

Tab.6 : Ergebnisse verschiedener Autoren bezüglich des ANuF-Nachweises bei chronischer Polyarthrititis
RA = chronische Polyarthrititis
AMiF = Antimitochondrialer Faktor

Autor	chron. Hepatitis	ANuF	AMiF	Sonstiges
Dietrichsen (1973)	13 HB _s Ag + 29 HB _s Ag -	21	0	alle ANuF pos.: HB _s Ag neg.
Husain (1974)	6	6	0	chron. akt. Hep., Titer $\geq 1:10$
Berthold (1972)	40 HB _s Ag + 53 HB _s Ag -	7 11	0 4	16 chron. akt. Hep., 24 Leberzirrhose
Bartholomew (1974)	(41)	41	0	23 chron. akt. Hep., 10 akute o. chron. Virushep.

Tab.7 : Ergebnisse verschiedener Autoren bezüglich des ANuF-Nachweises bei chronischer Hepatitis
AMiF = Antimitochondrialer Faktor

Arzneimittelinduzierter Pseudo LE :
(n.: G. Cohnen; Med. Kl. 71 : 790, 1976)

ANTIHYPERTONIKA	ANTIARRHYTHMICA	ANTI-KONVULSIVA	THYREOSTATIKA
Hydralazin	Procainamid	Diphenylhydantoin	Methylthiouracil
Reserpin	Practolol	Mephentoin	Propylthiouracil
α - Methyldopa		Trimethadion	Methimazol
Guanoxan		Primidon	
		Carbamazepin	
		Ethosuximid	
		Phenobarbital	

Tab. 8 : Medikamente, bei denen nach längerdauernder Applikation die Entwicklung eines Pseudo-L.e. beobachtet wurde (nach Cohnen, 1976)

Arzneimittelinduzierter Pseudo LE :

(n.: G. Cohnen; Med. Kl. 71 : 790, 1976)

ANTIINFEKTIOSE MITTEL	VERSCHIEDENE
Isoniazid	Chlorpromazin
p - Aminosalicylsäure	Venopyronum ^R
Streptomycin	D - Penicillamin
Penicillin	Orale Kontrazeptiva
Tetracycline	Goldsalze
Sulfonamide	Zytostatika
Griseofulvin	Benzodiazepin
	Phenylbutazon
	Methysergid

Tab.9 : Medikamente, bei denen nach längerdauernder Applikation die Entwicklung eines Pseudo-L.e. beobachtet wurde (nach Cohnen, 1976)

2. Charakteristika der ANuF (Ig-Klassen und Spezifität)

Durch Nachweis mit spezifischen Antiseren stellte sich heraus, daß die ANuF als Ig G-, Ig A-, Ig M-, Ig E- und Ig D-Antikörper auftreten können (Beickert 1972, Rosenthal et al. 1976). Die Darstellung der einzelnen Ig-Klassen kann dabei zur weiteren Differenzierung herangezogen werden, da es sich zum Beispiel beim L.e.d. vorwiegend um Ig G-Antikörper der Subklassen Ig G₁ und Ig G₃ handelt (Schur 1967), während bei gesunden Personen und Patienten mit chronischer Polyarthritis vor allem Antikörper vom Ig A- und Ig M-Typ nachzuweisen sind (Wiik 1974).

Zur Spezifität dieser Antikörper:

Grundsätzlich läßt sich sagen, daß die Seroreaktionen in den meisten Fällen Organ-, Substrat- und Art-unspezifisch verlaufen. Es müssen jedoch folgende Einschränkungen gemacht werden:

Als differentialdiagnostisches Merkmal kann u. U. eine gewisse Substratspezifität beim aktiven L.e.d. gewertet werden, da nur hier krankheitsspezifisch Antikörper gegen native DNS auftreten. Das gleiche gilt für die Organspezifität der ANuF beim Felty-Syndrom und der leukopenischen Polyarthritis:

Fast ausschließlich in diesen beiden Fällen treten granulozytenspezifische Antikörper auf (Beickert 1972, Rosenthal et al. 1976). Dagegen kommt Artspezifitäten mit Bevorzugung z. B. der Spezies Mensch vermutlich untergeordnete Bedeutung zu.

3. Differenzierung der Kernantigene

Es hat sich gezeigt, daß antinukleäre Seroreaktionen spezifisch gegen eine relativ große Anzahl von Kernantigenen gerichtet sein können. Im einzelnen handelt es sich dabei um:

- 1.) Desoxyribonucleoproteide (DNP)
- 2.) native DNS (v. a. beim L.e.d.)
- 3.) Histone
- 4.) Phosphatpufferextrakte aus Kernen
- 5.) andere lösliche Kernantigene
- 6.) Nucleolen-Bestandteile

Die Differenzierung der spezifischen ANuF soll dabei anhand des Bindungsmusters in der immunfluoreszenzoptischen Darstellung möglich sein, wobei z. B. hohe Titerstufen einer peripheren ringförmigen Fluoreszenz charakteristisch für die aktive Form des L.e.d. mit Antikörpern gegen DNS sind (Rosenthal et al. 1976). Die Fluoreszenz mit den in dieser Untersuchung verwandten Antigen-Materialien ließ allerdings - wie im Abschnitt "Methoden" näher beschrieben - keine eindeutige Aussage bezüglich der Bindungsmuster zu.

II. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

1. ANuF-positive Patientenserien

Es wurden 65 ANuF-positive Seren von 48 Patienten der I. Med. Klinik A und der Hautklinik der Universität Düsseldorf untersucht. Die Seren wurden dem Eingang der routinemäßigen ANuF-Laborbestimmung mit HEK (Hühner-Erythrozyten-Kerne) als Antigen in dem Zeitraum von Okt. 1975 bis Sept. 1977 entnommen. Die Kontrolluntersuchung von 41 dieser 65 Seren ergab für 12 Seren ein negatives Ergebnis. Bis zur Verarbeitung im Rahmen dieser Untersuchungsserie wurden die Seren bei - 20° C tiefgefroren aufbewahrt. Tab. 10) zeigt die Diagnosen der Patienten und die Zahl der im jeweiligen Fall erfüllten ARA¹ Kriterien. Die 1 1/4 klassischen ARA-Kriterien waren um 6 Parameter (nach Gross 1966) erweitert worden (Tab. 11). Für die Diagnosen ergibt sich kein einheitliches Bild ; es läßt sich lediglich eine Gruppe von Patienten (n=21) mit rheumatischen Erkrankungen - darunter 10 Patienten mit Lupus erythematoses - als Haupt- oder Nebenleiden abgrenzen. Die Zahl der erfüllten Kriterien steht dabei in keiner eindeutig feststellbaren Beziehung zur klinischen Diagnose.

Die Induktion eines Pseudo-L.e.d. nach Applikation bestimmter Medikamente konnte bei den Patienten mit nicht-rheumatischen Erkrankungen nicht beobachtet werden (Ausnahme: Verdacht auf Pseudo-L.e.d. unter Zentropil-Gabe).

* ARA= American Rheumatic Association

Tab. 10: Der klinischen Diagnose ist die Zahl der im jeweiligen Fall erfüllten ARA-Kriterien (erweitert nach Gross 1966) zugeordnet.

L.e.d. = Lupus erythematoses disseminatus

Patient	Hauptleiden	Nebenleiden	erfüllte ARA-Kri- terien
1.)	chron.Polyarthrititis	medikamentös: Parkinsonismus Depression	4
2.)	infektiöse Mononukle- ose		3
3.)	chron.Polyarthrititis		1
4.)	Iritis		0
5.)	Neuritis d.l. Auges	Hyperproteinämie	1
6.)	Granulomatöse Hepa- titis		0
7.)	vegetat.Dysregulati- on	Wirbelsäulen-Syndrom, Lungen-Emphysem	0
8.)	Nephrotisches Syn- drom		1
9.)	Harnwegsinfekt	funkt. Darmbe- schwerden	0
10.)	Mikrohämaturie	Verdacht: Glomerulonephritis	0

Patient	Hauptleiden	Nebenleiden	erfüllte ARA-Kri- terien
11.)	juvenile chron.Poly- arthritis	Defekt-Ig-A- Proteinämie	4
12.)	M. Hodgkin (IV)	Dysproteinämie	4
13.)	Nephrotisches Syndrom- minimal-change-Glomeru- lonephritis		2
14.)	L.e.d.	Hypertonie, Niereninsuffi- zienz	4
15.)	L.e.	proliferative Glomerulone- phritis	5
16.)	Akute Hepatitis	Urethrastenose m. Harnwegsinfekt; chron. Poly- arthritis	1
17.)	degenerative Wirbelsäulenver- änderungen		0
18.)	L.e.d.		3
19.)	L.e.d.		5
20.)	chron.Polyarthritits	Struma nodosa I ^o , Tonsillitis	5
21.)	Aplast. Anämie	Myocard-u.Leber- schaden;Diabetes mellitus	3

Patient	Hauptleiden	Nebenleiden	erfüllte ARA-Kri- terien
22.)	Raynaud-Syndrom	Sklerodemie ???	4
23.)	L. e.	Linksschenkel- block	5
24.)	Anämie, Thrombozyto- penie, Anisocytose		5
25.)	Sek. Endokarditis lenta	Aortenklappenin- suff., Allergie ge- gen Penicillin, Cephalosporine, Bactrim	2
26.)	chron. Hepatopathie (Zirrhose?)	Coronarinsuff.; Steroid-Diabetes	4
27.)	chron. Polyarthrititis	Herzinsuff. Hyper- tonus, Diabetes mellitus, Candidiasis	3
28.)	L. e. d.		1
29.)	L. e.	Hyperlipoprotein- ämie II	2
30.)	Virusinfekt		0
31.)	Myeloproliferatives Syndrom	chron. Polyarthrititis; Herzinsuff.; aplast. Anämie; Diabetes melli- tus; Hypersplenismus	7

Patient	Hauptleiden	Nebenleiden	erfüllte ARA-Kri- terien
32.)	L.e.	Harnwegsinfekt	5
33.)	Leberzirrhose	Myocardinsuff.	3
34.)	Coronarinsuffizienz	chron. Emphysem- bronchitis; Degen. Wirbelsäulenver- änderungen	0
35.)	Verdacht auf Glomeru- lonephritis		1
36.)	Zustand nach Herz- klappenersatz	Hepatopathie, Myocarinsuff.	1
37.)	L.e.d. (Pseudo-L.e. nach Zentropil?)	Epilepsie	2
38.)	Zystennieren, Nieren- insuff.	arterielle Hyper- tonie	1
39.)	L.e.	Xeroderma pigmento- sum, Porphyria cutanea tarda	3
40.)	Akutes rheumat. Fieber m. Pancarditis	Allergie gegen Lokal- anästhetika	3
41.)	Hyperlipoproteinämie II	Adipositas	0
42.)	Lungen-Tuberkulose	chron. Polyarthritits	2

Patient	Hauptleiden	Nebenleiden	erfüllte ARA-Kri- terien
43.)	akute Linksherz- insuffizienz	L.e., arterielle Hypertonie; Diabetes mellitus	4
44.)	Splenomegalie	Fettstoffwechsel- störung II b, Erythrozyturie	1
45.)	Lentigo maligna melanoma IV		3
46.)	Komb. Aorten- u. Mitralvitium Grad III	allg. Arterio- sklerose, Hyperlipi- dämie	1
47.)	Immunozytom		0
48.)	chron. Hepatitis (wenig aggressiv)		0

- 1.) Gesichts-Erythem
- 2.) Discoidaler Lupus
- 3.) Raynaud-Phänomen
- 4.) Alopezie
- 5.) Photosensibilität
- 6.) Orale / nasopharyngeale Ulceration
- 7.) Arthritis ohne Deformität
 - a) Bewegungsschmerz
 - b) Schwäche
 - c) Erguß / Schwellung
- 8.) L.e.Zellen
- 9.) Chron. falsch-Pos. serolog. Treponema-Suchtest
- 10.) Proteinurie > 3,5 g/die
- 11.) Zell-Zylinder
- 12.)
 - a) Pleuritis
 - b) Perikarditis
- 13.)
 - a) Psychose
 - b) Konvulsionen
- 14.)
 - a) hämolyt. Anämie
 - b) Leukopenie (< 4.000)
 - c) Thrombocytopenie (< 100.000)
- 15.) Lungeninfiltrate
- 16.) Abnorme Schleimsekretion (gastrointest.)
- 17.) Lupoide Hepatitis
- 18.) Polyadenie
- 19.) Splenomegalie
- 20.) Pathologisches EKG

Die Parameter (1) bis (14) sind identisch mit den ARA-Kriterien. Die Parameter (15) bis (20) wurden nach Gross (1966) ergänzt.

2. Kontrollseren

Zum Vergleich wurden 50 Seren von gesunden Blutspendern aus dem Institut für Blutspende- und Transfusionswesen der Universität Düsseldorf (Direktor Prof. Dr. Brüster) herangezogen.

III. METHODIK

In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Verfahren zum Nachweis antinukleärer Faktoren als praktikabel erwiesen. Dazu gehören im einzelnen:

1. Komplement-Bindungs-Reaktionen (KBR)
2. Latex-Teste
3. Präcipitations-Methoden
4. Antiglobulin-Konsumptions-Teste (AGKT)
5. Agglutinations-Teste
6. Counter-Immun-Elektrophorese (CIE)
7. Radioimmunoassay (RIA)
8. Indirekte Immunfluoreszenz (indir. IFI)

Die indirekte Immunfluoreszenz gehört dabei zu den bereits seit längerer Zeit etablierten Verfahren.

Diese Methode wurde gewählt, da sie sich vor allem durch folgende Vorzüge gegenüber den übrigen genannten Verfahren auszeichnet:

1. Sensibilität

Nach Aussagen verschiedener Untersucher übertrifft die indir. IFI in dieser Hinsicht nahezu alle anderen Nachweisverfahren für ANuF (Chapmann 1976, Jäger 1976, Fischer u. Dorszewski 1965, Pastner 1975). Zum einen nämlich kommen bei Verwendung polyvalenter Konjugate ANuF verschiedener Immunglobulin-Klassen zur Darstellung. Weiterhin werden im Gegensatz zu Methoden, bei denen der Nachweis von einer bestimmten Eigenschaft des Antikörpers abhängt, wie etwa zu präcipitieren bzw. zu agglutinieren oder Komplement zu binden, sämtliche Antikörper erfaßt.

Dies trifft nach Beobachtungen von Häcki und Grob (1976)

auch im Vergleich zu dem als außerordentlich empfindlich geltenden RIA zu, der durch die Möglichkeit, z. B. nur Anti-DNS-Antikörper nachzuweisen, beim Suchtest lediglich ein Drittel der mit der indir. IFI erfaßten ANuF-positiven Seren und zwei Drittel aller L.e.d.-Seren zur Darstellung bringen soll.

Im übrigen beruht die hohe Sensibilität der indir. IFI auch auf dem weiter unten näher erläuterten Verstärkereffekt.

2. Spezifität

Während die Sekundär-Reaktionen (= Indikator-Reaktionen wie z. B. KBR) u. U. auch ohne vorhergehende primäre Antigen-Antikörper-Bindung ablaufen können (Jäger 1976) werden bei der indir. IFI nur tatsächlich vollzogene Antigen-Antikörper-Reaktionen zum Nachweis der ANuF herangezogen. Der RIA ergibt zwar im Falle des Anti-DNS-Antikörper-Nachweises eine deutlich höhere Spezifität für L.e.d., jedoch wird dieser Vorteil mit einer erheblichen Einschränkung der Sensibilität erkaufte und ist u. U. beim Routine-Test sogar wenig erwünscht, so daß dieses Verfahren für den screening-Test zur Erfassung multipler rheumatischer Erkrankungen als weniger geeignet erscheint und eher als Ergänzung zu differentialdiagnostischen Zwecken herangezogen werden sollte (Häcki u. Grob 1976).

3. Verfügbarkeit

Durch die Möglichkeit, das fertig präparierte Antigen-Material über einen Zeitraum von 6-8 Tagen ohne Aktivitätsverlust aufbewahren zu können, ist ohne umfangreiche Vorbereitung eine bedarfsgerechte Einsatzfähigkeit des Tests gewährleistet. Dieser Umstand kann

in Verbindung mit der hohen Sensibilität des Verfahrens dazu genutzt werden, eine stetige und differenzierte serologische Verlaufskontrolle eines bestimmten Krankheitsbildes zu erhalten.

4. Praktikabilität

Ohne wesentlich erhöhten Aufwand kann durch den Einsatz von Mehrfach-Objektträgern mit 10-12 Reaktionsfeldern auch eine größere Anzahl von Seren in einem Arbeitsgang untersucht werden. Für die Labor-Routine beachtenswert sind ebenso die im Verhältnis zu radiologischen Bestimmungen deutlich geringeren laufenden Kosten, wobei einschränkende gesetzliche Bestimmungen entfallen, wie sie etwa für den Umgang mit radioaktivem Material existieren. So ist in praktisch jedem Labor die Möglichkeit zur Durchführung des Tests gegeben, ohne daß man etwa auf das Vorhandensein eines speziellen Isotopenlabors angewiesen wäre. Nicht zuletzt kommt der Tatsache Bedeutung zu, daß dem Untersucher nach Anfertigung der Präparate für die Beurteilung ein beträchtlicher Zeitraum von bis zu 48 Stunden zur Verfügung steht.

Im Prinzip handelt es sich bei der indir. IFI um zwei aufeinanderfolgende Antigen-Antikörper-Reaktionen. Ein vorgegebenes Antigen - hier Zellkerne - wird mit dem fraglichen Patientenserum inkubiert. Enthält das letztere nun Antikörper gegen Zellkernmaterial (= ANuF), so werden diese an das Antigen gebunden. Im ersten Waschgang werden nichtgebundene Proteine entfernt. Danach wird der Objektträger mit einem FITC (=Fluoresceinisothiocyanat)-markierten Anti-Human-Immunglobulin inkubiert. Dieses wird nun wiederum an die antigene Komponente des Immunglobulins des vorher entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes gebunden. In einem zweiten

Waschgang wird anschließend überschüssiges, d. h. nicht-gebundenes, Konjugat entfernt. Die Auswertung und Beurteilung der Fluoreszenz von Zellkernen kann mit Hilfe eines geeigneten optischen Systems (Immunfluoreszenzmikroskop) durchgeführt werden.

Theoretisch denkbar wäre auch der Nachweis antinukleärer Faktoren durch den direkten Fluoreszenz-Test, bei dem das farbstoffmarkierte Probandenserum mit dem Antigen inkubiert würde. Dabei erweist sich jedoch die Fluorochromierung jedes einzelnen Serums als nicht praktikabel. Außerdem ginge der aus der zweifachen Antigen-Antikörper-Reaktion beim indirekten Test resultierende Verstärkereffekt verloren. Diese Sensibilitäts-Steigerung wird dadurch hervorgerufen, daß mit einem Globulin-Molekül des Patienten-Serums stets mehrere Konjugat-Moleküle reagieren (Bild I).

.

Konjugat = FITC-markiertes
Anti-Human-Immunglobulin

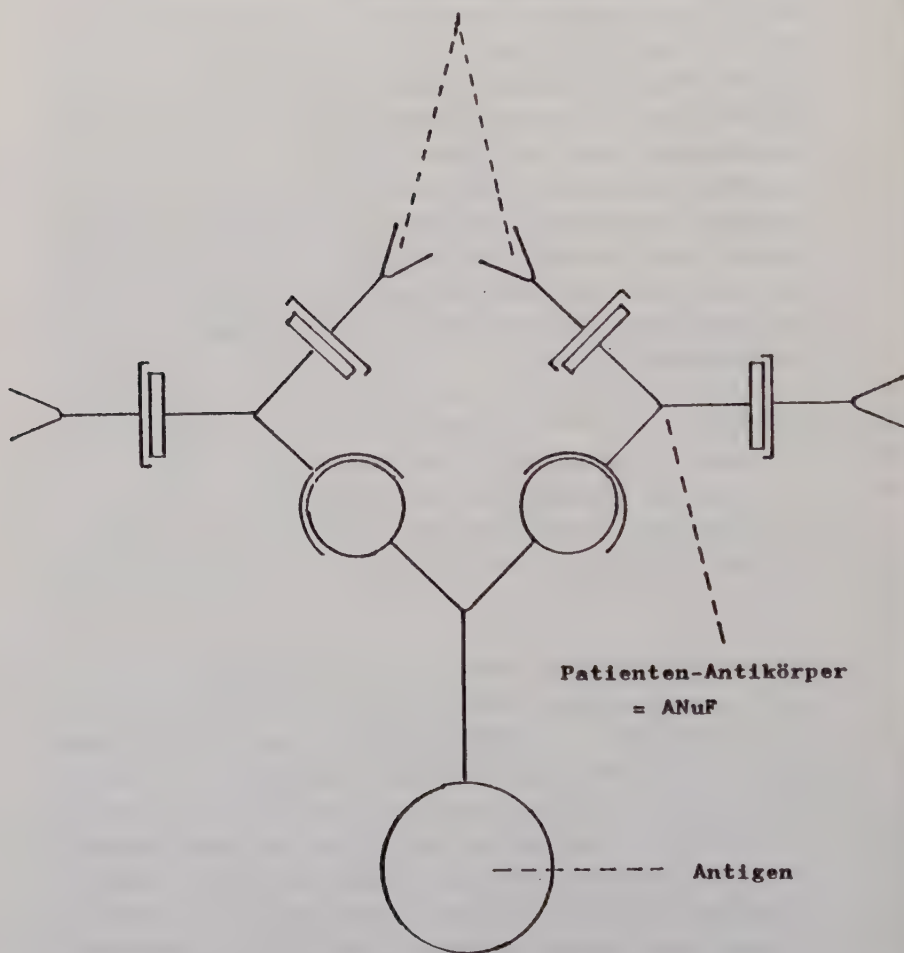


Bild I : Der Verstärkereffekt des indirekten Immunfluoreszenztestes beruht darauf, daß mit einem Globulin-Molekül des Patientenserums (ANuF) stets mehrere Konjugatmoleküle reagieren

5. Antigen

Das Antigen stellt bei der vorliegenden Vergleichsstudie die einzige Variable dar, während alle anderen Faktoren konstant gehalten wurden.

- a) Im eigenen Testsystem wurden Hühner-Erythrozyten-Kerne (= HEK) als antigenes Material verwandt. Die HEK wurden zum einen gewählt, da sie sich im Vergleich zu anderen häufig benutzten antigenen Substraten, wie etwa Gefrierschnitten von Mäuse- oder Rattenleber, durch die hohe Sensibilität auszeichnen sollen und die mikroskopische Beurteilung bei hohen Titerstufen infolge kontrastreicherer Darstellung eindeutiger sein soll (Drazdakova 1970). Zum anderen waren jedoch Vorzüge ausschlaggebend, die dieses Substrat besonders für die Labor-Routine geeignet erscheinen lassen. So können die HEK leicht isoliert werden, sind homogen und als 10 %ige Suspension ca. ein Jahr tiefgefroren wie auch aufgetropft auf Objektträger nach Lufttrocknung für einen Zeitraum von ca. 6-8 Tagen ohne Aktivitätsverlust haltbar (Albini u. Wick 1972). Durch diese Eigenschaft ist die für einen Routine-Test notwendige rasche und bedarfsgerechte Verfügbarkeit - und damit die Einsatzbereitschaft - gegeben. Die HEK wurden nach der Methode von Ten Veen und Feltkamp (1969) (Erstbeschreibung durch Feltkamp und Kruyff 1963) folgendermaßen präpariert:

Benötigt wurde zunächst eine Alsever-Lösung, bestehend aus:

Glucose	24,6 g
Na-Citrat	9,6 g
NaCl	5,04 g
Aqua dest. ad	1200 ml

Diese Lösung wurde mit Zitronensäure auf einen pH-Wert von 6,1 eingestellt und durch Ultrafiltration sterilisiert. Frisches Hühnerblut wurde mit der Alsever-Lösung im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Dann wurden die Zellen dreimal mit 0,01 molarer phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Zur Hämolysierung wurde eine 10 %ige Suspension der Erythrocyten mit 0,45 %iger Saponin-Lösung 1 : 1 verdünnt. Nach zwei Minuten wurden die hämolysierten Zellen für 2 min. bei 2000 g zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Die Kerne wurden dann dreimal mit PBS gewaschen.

Eine Fixierung wurde vorgenommen durch Zugabe von einem Teil 40 %igen Formalins auf 10 Teile einer 10 %igen Suspension der Kerne in PBS. Nach 18-stündiger Aufbewahrung bei + 4° C wurde wiederum 40 %iges Formalin im gleichen Verhältnis zugegeben. Die Fixierung war nach 48 Stunden beendet. Der Überstand wurde verworfen. Eine 10 %ige Suspension der Kerne in PBS diente als Stammlösung, die bis zum Gebrauch in kleinen Portionen bei - 20° C aufbewahrt wurde. Zur Durchführung des Tests mußte eine Gebrauchslösung in der Verdünnung 1 : 8 mit 0,9 %iger NaCl-Lösung hergestellt werden. 0,01 ml dieser Gebrauchslösung wurden auf jedes der 12 Reaktionsfelder der bei diesem Test benutzten Mehrfach-Objektträger* aufgetropft. Nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur konnte das fertig präparierte Antigen so für mehrere Tage ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

- b) Als Vergleichsantigen dienten Kulturen von baby-hamster-kidney (= BHK)-Zellen, die bereits gebrauchsfertig auf Mehrfach-Objektträgern aufgebracht waren.

* Hersteller: Fa. Behring, Marburg/Lahn

Dieses Antigen-Material wurde uns freundlicherweise zu Testzwecken von der Firma Behring (Marburg) zur Verfügung gestellt.

6. Konjugat

Für beide Tests wurde dieselbe Charge eines polyvalenten Anti-Human-Immunglobulins der Fa. Behring verwandt. Das Antiserum war durch Immunisierung von Ziegen mit einer Mischung von Ig G, A, M gewonnen worden. Die Verwendung eines polyvalenten Konjugates (im Gegensatz zu einem monospezifischen) erschien notwendig, da von zahlreichen Autoren die Zugehörigkeit der ANuF zu den Ig-Klassen G, A, M, E und neuerdings auch D nachgewiesen wurde (Rosen-thal et al. 1976, Beickert 1972). Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Gebrauchsverdünnung des Konjugates für beide Antigene unabhängig voneinander durch Schachbrett-Titration ermittelt. Der Plateauendpunkt lag in beiden Fällen bei einer Konjugat-Verdünnung von 1 : 32, woraus eine optimale Gebrauchsverdünnung mit möglichst eindeutiger Darstellung positiver und negativer Seren von 1 : 16 folgte. Der Gehalt an Anti-Human Ig G als quantitativ bedeutendster Fraktion wurde mittels umgekehrter Immundiffusion bestimmt und betrug 10 I.E./ml. Daraus ergibt sich für die Gebrauchsverdünnung ein Ig G-Antikörper-Gehalt von 0.31 I.E./ml.

7. optisches System

Zur Beurteilung der Präparate wurde ein Zeiss-Mikroskop vom Typ Standard RA in Verbindung mit der Fluoreszenz-leuchte II und der Quecksilber-Höchstdruck-Lampe HBO 200 W/4 verwandt. Es wurde mit Durchlicht-Beleuchtung gearbeitet. Dabei wurden das Erregerfilter BG 3 (Best.-Nr. 467883) und das Sperrfilter Nr. 50 benutzt. Hierbei

kommt der Konstanz der wesentlichen Faktoren, d. h., Lichtquelle, Erreger- und Sperrfilter, besondere Bedeutung zu, da bereits bei geringen Änderungen, z. B. der Filterdichte, eine vergleichende visuelle Bewertung verschiedener Präparate nicht mehr möglich ist. Für die photographische Dokumentation wurden hochempfindliche Ektachrome-Filme vom Typ EHB und 160 (Kunstlicht) mit Belichtungszeiten von 6 min. verwandt (Bild II, III, IV, V). Zur Gewährleistung standardisierter Bedingungen wurde die Beurteilung der immunfluoreszenzoptischen Präparate von nur einem Untersucher vorgenommen. Die mitunter beschriebene Feststellung eines Bindungsmusters war bei den HEK nicht möglich; auch bei den BHK-Zellen war ein solches teilweise nicht eindeutig zu differenzieren. Anhand des Bindungsmusters soll eine Unterscheidung der spezifischen ANuF möglich sein, da das immunfluoreszenzoptische Bild ein für die Bindung des Antikörpers an ein bestimmtes Kern-Antigen charakteristisches Muster aufweisen soll.

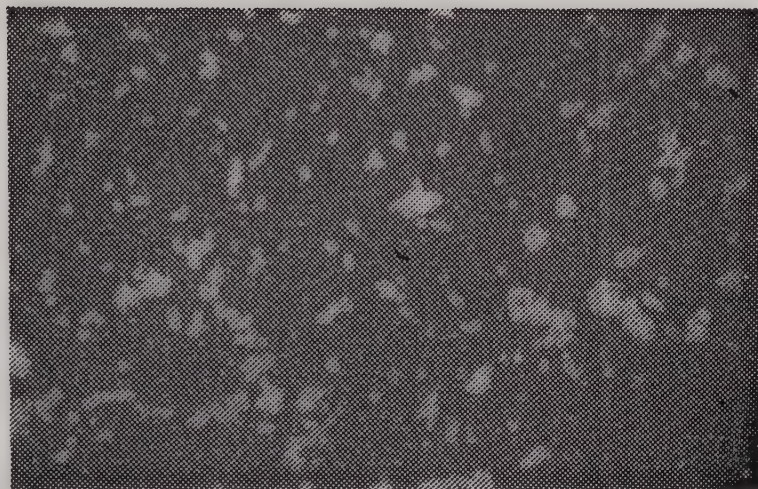


Bild II : Negative Kontrolle bei HEK

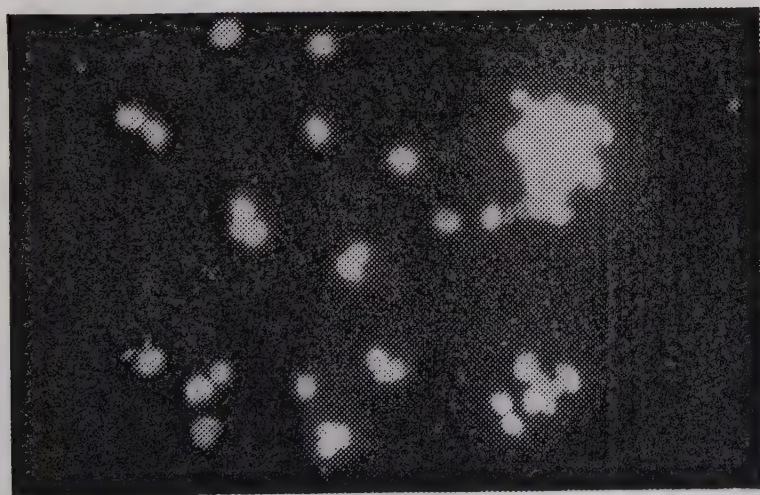


Bild III : Positive Fluoreszenz bei HEK
(Stärkere Vergrößerung als oben)

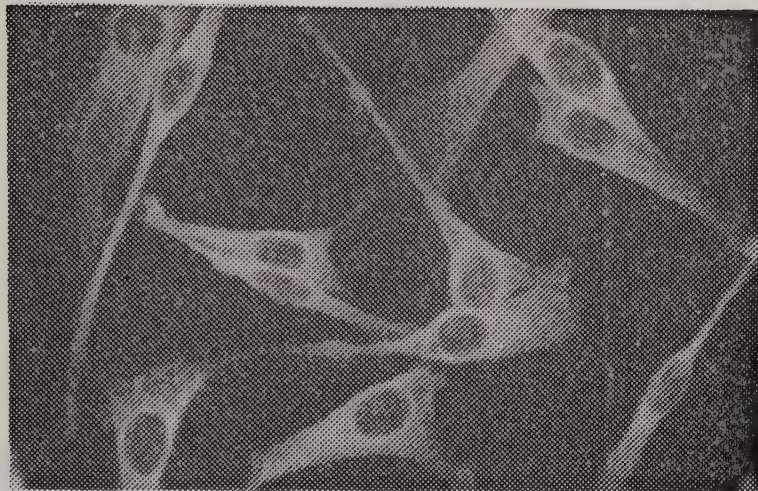


Bild IV : Negative Kontrolle bei BHK-Zellen

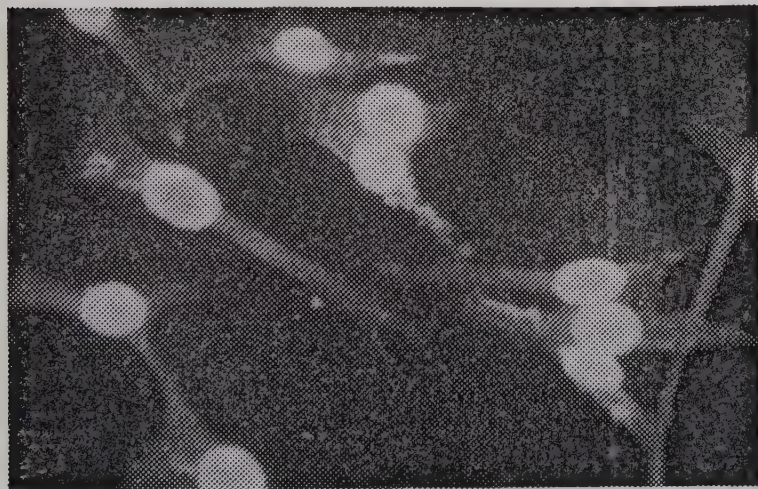


Bild V : Positive Fluoreszenz bei BHK-Zellen

8. Testdurchführung (Bild VI)

- a) Auf jedes Feld der vorbereiteten (s.III,5) Objektträger wurden 0,01 ml der jeweiligen Verdünnung des Probandenserums aufgetragen.
- b) Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer.
- c) Eine 30-minütige Waschung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit Badwechsel nach 15 min. schloß sich an. Zur Vermeidung eines Ineinanderfließens der Seren und daraus folgender Verfälschung der Ergebnisse sollten die Objektträger vor dem Einführen in die Kuvette kurz mit PBS-Lösung abgespritzt werden. Abschließend wurden die Objektträger kurz mit Aqua dest. gespült.
- d) Nach dem Abtropfen wurden jeweils 0.01 ml der Konjugat-Gebrauchsverdünnung aufgetragen.
- e) Die Schritte b) und c) werden wiederholt. Überschüssige Flüssigkeit wurde wiederum durch Abtropfen entfernt. Eine Austrocknung der Objektträger wurde ebenso wie nach dem ersten Waschgang vermieden.
- f) Zum Schluß wurden die Deckgläser vermittels eines Tropfens gepufferter Glycerin-Lösung (Glycerin : PBS = 9 : 1) pro Reaktionsfeld auf die Objektträger aufgebracht.
- g) Die fertigen Präparate wurden bei + 4° C bis zur Beurteilung aufbewahrt. Diese erfolgte meistens noch am selben Tag, frühestens aber ca. zwei Stunden nach Fertigstellung der Präparate.

Bei den mit BHK-Zellen beschichteten Objektträgern verliefen die Arbeitsschritte entsprechend.

6)

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

30 min Inkubation in beuchter Kammer

7)

0	0
0	0
0	0
0	0
0	0
0	0

in Kuvette 3 + 15 min Vorbelang in PBS
in Spülen in Aqua de

8)



Abtropfen lassen

9)

0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

1 Tropfen gepuffter Glyzerinlösung auf jedes Feld

10)

0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0



Glycerinlösung auf Deckglas auftragen, lufttrocknen
vergoldeten

9. Interpretation der Titerstufen

Die diagnostische Aussagekraft des antinukleären Faktors wird wesentlich erweitert, wenn zur Differenzierung die Titerhöhe eines positiven Serums herangezogen wird.

Während bei gesunden Probanden im höheren Alter (>60 J.) und bei Patienten mit nichtrheumatischen Erkrankungen Titer bis 1 : 40 auftreten können, deutet das Vorliegen wesentlich höherer Titerstufen auf ein rheumatisches Krankheitsgeschehen hin (Rosenthal et al. 1976, Ritchie 1967). So werden etwa ANuF-Titer von bis zu 1 : 160 bei der chronischen Polyarthritiden gefunden, von 1 : 160 und höher vorwiegend beim Lupus erythematoses und der Sklerodermie. Dagegen schließt ein negativer ANuF-Nachweis die Diagnose eines L.e. nahezu aus (Rosenthal et al. 1976, Ritchie 1967). Die genannte Verteilung der Titerstufen entspricht weitgehend den eigenen Beobachtungen bei der vorliegenden Untersuchungsserie, wobei jedoch auch im Falle einer granulomatösen Hepatitis und eines Virusinfektes ohne weitere Diagnose Titer von über 1 : 160 auftraten. Die Patientenserum ergaben bei Untersuchung mit BHK-Zellen im Durchschnitt höhere positive Titer als mit HEK.

10. Probandensera

Für die Seren wurde bei dem Test mit HEK eine Anfangsverdünnung von 1 : 10 gewählt, da sich bei den Versuchen gezeigt hatte, daß erst ab dieser Verdünnungsstufe eine klare Abgrenzung zwischen negativen Seren mit unspezifischer Plasmafluoreszenz und tatsächlich positiven Seren - und damit Reproduzierbarkeit der Ergebnisse - zu erzielen war. Aus demselben Grunde empfahlen die Behringwerke, für die BHK-Zellen eine Anfangsverdünnung von 1 : 40 zu wählen. Dementsprechend

wurde in diesem Falle die Fluoreszenz der Präparate erst bei einem Titer von mindestens 1 : 40 als positiv bewertet. Die niedrigeren Titerstufen wurden bei den BHK-Zellen lediglich zur Feststellung der Abweichung beider Testsysteme voneinander herangezogen. Die weiteren Verdünnungen erfolgten in geometrischer Reihe, also 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 usw. Bei der Routineuntersuchung mit HEK wurde eine Vorauswahl durch zwei Verdünnungsstufen (1 : 10 und 1 : 100) getroffen. Sämtliche Serum-Verdünnungen wurden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung ausgeführt, so daß ein konstanter pH-Wert gewährleistet war.

Da in der Literatur keine gesicherten Daten über die Bedeutung des Komplements bei der Darstellung antinukleärer Faktoren existieren, wurde auf den Zusatz von Komplement zum Probandenserum verzichtet. So benutzten manche Untersucher (Widelock 1961, Stojan 1975, Goldwasser et al. 1958, Muna et al. 1966, Rosenthal et al. 1976) die Zugabe von Komplement, um durch die Komplement-Bindung antinukleärer Faktoren eine weitere Differenzierung dieser Antikörper vornehmen zu können oder eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Der erste Punkt - eine weitere Differenzierung - war bei der vorliegenden Fragestellung nicht Gegenstand der Untersuchung; der zweite - die verbesserte Reproduzierbarkeit - wird durch die Ergebnisse anderer Autoren nicht bestätigt.

Eine Komplement-Abhängigkeit antinukleärer Seroreaktionen konnte bisher in keinem Fall nachgewiesen werden.

11. Kontrollen

Bei jeder Testserie wurden vier Kontrollen mitgeführt. Diese bestanden aus zwei eindeutig positiven Humanseren, einem negativen Humanserum und phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Auch die Serumkontrollen wurden mit PBS verdünnt.

12. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Für Differenzen bei den Ergebnissen verschiedener Untersuchungen wurden Abweichungen im Bereich von ± 2 Titerstufen als tolerabel angesehen. Dieser Bereich erschien sinnvoll, da aus der Addition zweier Beurteilungsfehler um jeweils eine Stufe in zwei unabhängigen Testserien - z. B. bei nicht eindeutiger positiver Fluoreszenz desselben Serums - eine Abweichung von insgesamt 2 Stufen resultiert. Bei wiederholter Untersuchung von 41 Patientenserum jeweils mit beiden Testsystemen zeigte das Antigen der Behringwerke eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da hier $41/41 = 100\%$ der Resultate innerhalb eines Bereiches von zwei Titerstufen lagen, während es bei den HEK nur $37/41 = 90,2\%$ waren (Tab. 12).

Tab. 12

Abweichungen innerhalb eines Testsystems
bei wiederholter Untersuchung

Differenz in Titerstufen	Anzahl der Sera	
	HEK	BHK
0	12 = 29,3 %	19 = 46,3 %
1	14 = 34,1 %	17 = 41,5 %
2	11 = 26,8 %	5 = 12,2 %
3	3	0
4	0	0
5	1	0
	41	41

HEK : 37/41 = 90,2 % innerhalb 2 Stufen

BHK : 41/41 = 100 % innerhalb 2 Stufen

IV. ERGEBNISSE

Tab. 13) zeigt die allgemeine Übereinstimmung beider Testsysteme im Hinblick auf die Zahl der positiven und negativen Ergebnisse ohne Berücksichtigung der Titerhöhe, wobei jedoch die unterschiedlichen Grenztiter von 1 : 40 bei den BHK-Zellen und 1 : 10 bei den HEK zugrundegelegt wurden. Bei Betrachtung der Kontrollgruppe ergibt sich hier für die BHK-Zellen mit $1/50 = 2\%$ gegenüber $3/50 = 6\%$ bei den HEK ein deutlich geringerer Anteil positiver Ergebnisse. Ähnlich hoch fällt die Differenz bei den Patientenseren aus, da auch hier die BHK-Zellen mit $23/65 = 35,4\%$ gegenüber $53/65 = 81,5\%$ bei den HEK eine wesentlich geringere Anzahl positiver Ergebnisse aufweisen.

In Tab. 14) und 15) sind die Abweichungen der Ergebnisse beider Testansätze voneinander für die Patienten - bzw. Kontrollseren dargestellt. Im Falle der Patientenseren lagen $57/65 = 88\%$ innerhalb des unter III,12 erläuterten Toleranzbereiches von ± 2 Titerstufen; bei den Kontrollseren waren es $48/50 = 96\%$.

Korrelation der Titerhöhe mit der Zahl der erfüllten ARA-Kriterien

17 der 48 Patienten wiesen mindestens 4 erfüllte Kriterien auf. Nach Definition der ARA (Cohen et al. 1971) berechtigt die Feststellung von mindestens 4 dieser Parameter zur Diagnose eines L.e.d. Eine Korrelation zwischen positivem ANuF-Titer bzw. der Titerhöhe und diesen Kriterien war dabei nicht erkennbar, da lediglich 4 dieser Patienten bei der Untersuchung mit BHK-Zellen und ein Patient bei der Untersuchung mit HEK einen bei L.e.d. zu erwartenden positiven ANuF-Titer von mindestens 1 : 160 aufwies.

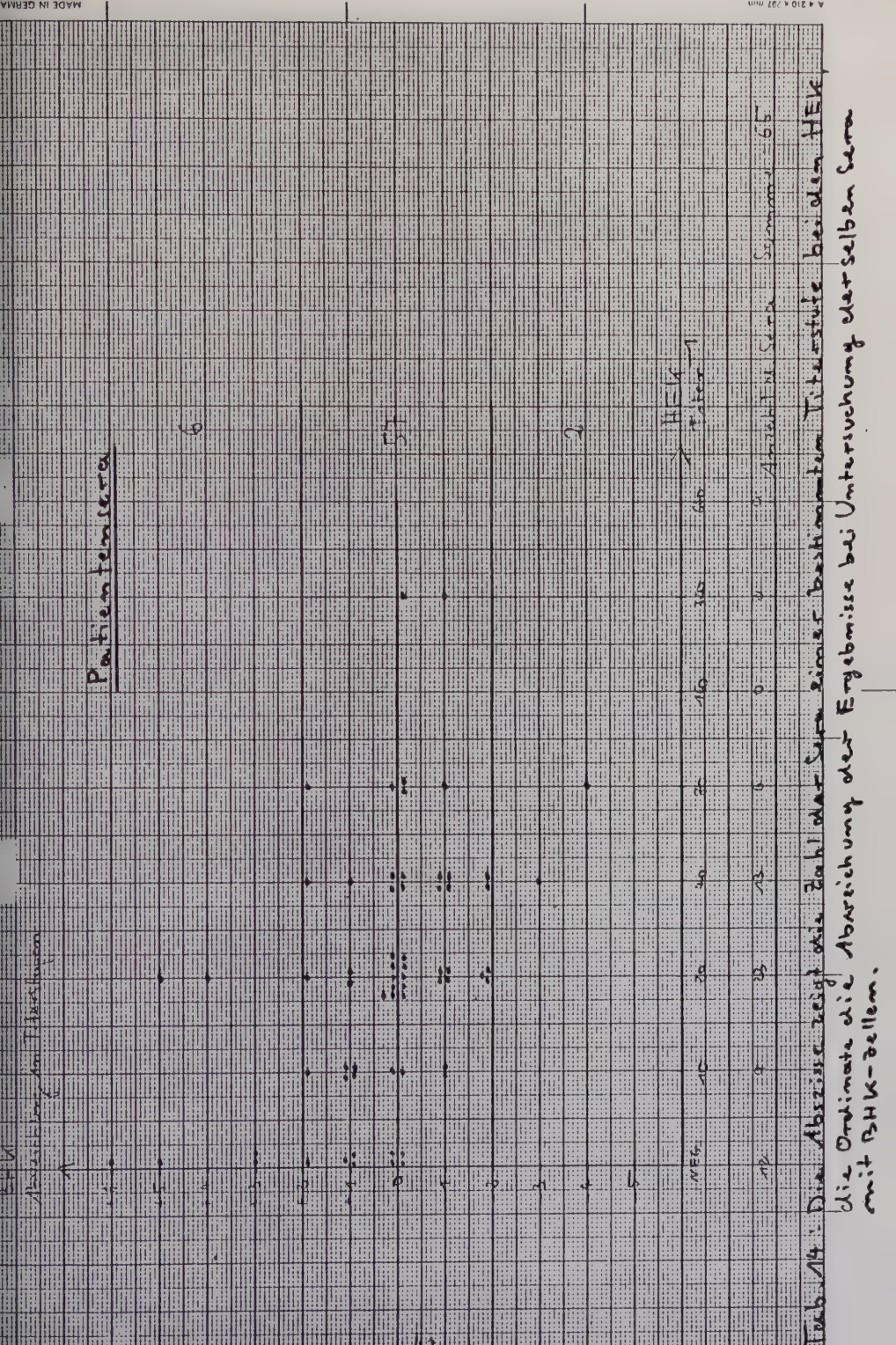
Tab. 13 Anzahl der positiven und negativen Ergebnisse

	BHK		HEK	
	pos.	neg.	pos.	neg.
Kontrollsera	1	49	3	47
n = 50	<u>= 2 %</u>		<u>= 6 %</u>	
Patientensera	23	42	53	12
n = 65	<u>= 35,4 %</u>		<u>= 81,5 %</u>	

Positiv bewertet wurden bei den

BHK-Zellen Titer $\geq$ 1:40

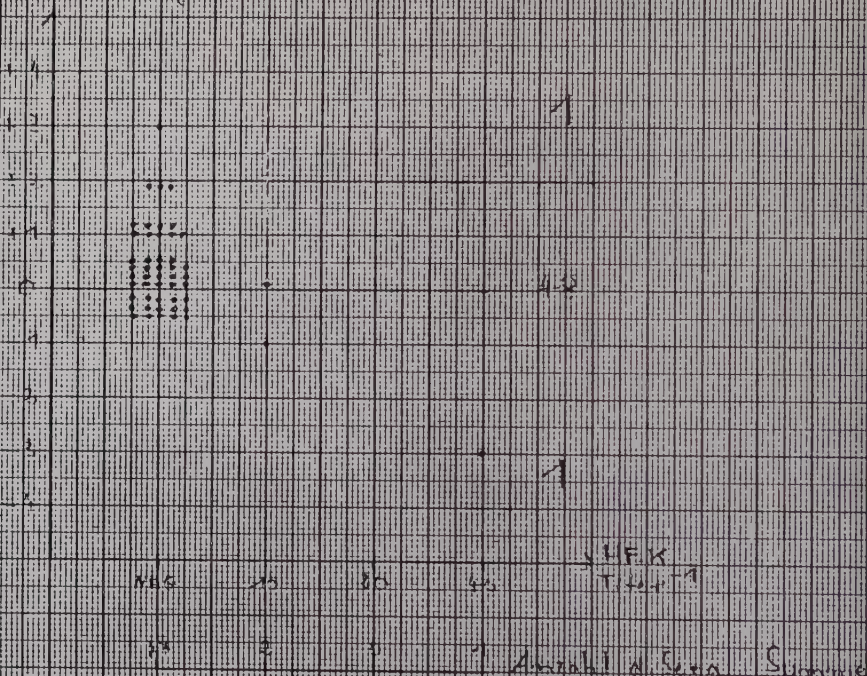
HEK Titer $\geq$ 1:10



Sera von Blutspendern

Tab. 18

Abweichung im Eitestufen



Tab. 18: Die Abszissen zeigt die Zahl der Sera einer bestimmten Titerstufe bei dem J.F.K. die Ordinate die Abweichung der Ergebnisse bei Untersuchung derselben Sera mit BHK-Zellen

V. DISKUSSION

Die grundsätzlichen methodischen und prinzipiellen Vorzüge der indirekten Immunfluoreszenz wurden bereits unter Punkt III. erläutert. Hervorgehoben seien an dieser Stelle nochmals die wesentlichen Merkmale:

1. Hohe Sensibilität
2. Praktikabilität, infolge relativ einfacher Testdurchführung, wobei als zusätzliche Laborausstattung lediglich ein Fluoreszenz-Mikroskop benötigt wird. (Eine entsprechende Ergänzung vorhandener Mikroskope ist ebenso möglich.)
3. Die weiter unten beschriebene Erfassbarkeit aller den Test beeinflussenden Komponenten, wodurch die Möglichkeit einer Standardisierung und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Laboratorien gegeben ist.

Im folgenden soll nun auf die in dieser Vergleichsserie mit zwei speziellen antigenen Substraten (BHK-Zellen und HEK) gemachten Erfahrungen abgehoben werden.

1. Zur Methode

a) Versuchsdurchführung

Bei der Herstellung der Präparate erwiesen sich naturgemäß die BHK-Zellen als das leichter zu handhabende Substrat, da dieses Antigen-Material bereits gebrauchsfertig präpariert vorlag und daher die zahlreichen Arbeitsschritte, die etwa zur Isolation der HEK notwendig waren, entfielen. Aus diesem Grunde war auch eine bei den HEK vorhandene Fehlerquelle ausgeschaltet: Wurde die HEK-Suspension unter zu starkem Luftzug auf den Objektträgern getrocknet, konnte es zu einer ungleichmäßigen Verteilung oder auch zum Abschwimmen der Suspension von den einzelnen Reaktionsfeldern kommen.

Auch bei der mikroskopischen Beurteilung der Präparate zeigten die BHK-Zellen Vorteile. Die Fluoreszenz dieses im Vergleich zu den HEK deutlich größeren Substrates war im allgemeinen besser erkennbar, wodurch die Feststellung eines Bindungsmusters ermöglicht wurde. Über eine eventuelle Korrelation des Bindungsmusters mit der Diagnose ließ sich jedoch nichts aussagen, da dieses zum einen auch bei identischen Diagnosen keine Einheitlichkeit aufwies und ebenso mitunter innerhalb einer Verdünnungsreihe desselben Serums variierte. Im übrigen konnte die Beurteilung erschwert werden, wenn der Kontrast der Präparate - speziell bei sehr niedrigen oder sehr hohen Titerstufen - durch zu dichte Aneinanderlagerung der Zellen verringert wurde. Die HEK ließen im Gegensatz dazu auch in kritischen Fällen eine eindeutige Aussage zur Abgrenzung negativer und positiver Befunde zu, da die Kernfluoreszenz besser von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden war.

Schwierigkeiten konnten hier allerdings fluoreszierende Verunreinigungen auf den Reaktionsfeldern bereiten, die durch zusätzliches Abspülen mit Aqua dest. weitgehend ausgeschaltet wurden.

Der Kontrast der HEK kann außerdem durch eine Gegenfärbung des Hintergrundes weiter angehoben werden.

b) Standardisierung

Um eine Vergleichbarkeit der mit unterschiedlichen Antigenen arbeitenden Testansätzen erhaltenen Ergebnisse zu ermöglichen, ist zumindest eine Bestimmung der Konjugat-Parameter erforderlich. Dies geschieht - auf das hier verwandte Konjugat bezogen - folgendermaßen: (nach Misgeld 1972)

1. Benennung
= FITC-markiertes Anti-Human Ig G, A, M von der Ziege
2. Immunologische Spezifität
= Anti-Human Ig G, A, M
3. Immunologische Spezifität
= 10 I.E./ml
4. Optische Sensivität
= Farbstoff / Protein-Gewichtsverhältnis
(F/P-Quotient) = 2,5
5. Immunologische und optische Effektivität
= Schachbrett-Titration mit ANuF-positiven Kontroll-Seren

Da im vorliegenden Fall für beide Antigene dieselbe Charge eines bekannten polyvalenten Konjugats (Hersteller: Fa. Behring, Marburg/Lahn) verwandt wurde, war für die BHK-Zellen entsprechend Punkt 5.) lediglich die Ermittlungen der optimalen Konjugat-Gebrauchsverdünnung

durch Schachbrett-Titration erforderlich. (Es ergab sich auch hier ein Verdünnungs-Verhältnis von 1 : 16.) Unter den gegebenen Bedingungen zeigte das Antigen der Behringwerke bei wiederholter Untersuchung desselben Serums die unter III,12 dargestellte bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Will man im übrigen eine noch weitergehende Vergleichbarkeit erzielen - z. B. in Bezug auf die Ergebnisse verschiedener Laboratorien -, sollte man auf die inzwischen verfügbaren Standard-Präparate der WHO (world health organisation) zurückgreifen. Auf diese Weise ist es möglich, die Immunfluoreszenzergebnisse verschiedener Laboratorien als relativen Wert eines verbindlichen Standards auszudrücken. Außerdem könnte dadurch die quantitative Darstellung des absoluten Anti-Human-Immunglobulin-Gehaltes des Konjugats entfallen. Schließlich gewinnt auch die Objektivierung der mikroskopischen Beurteilung an Interesse, die durch den Einsatz photometrischer Techniken zur Quantifizierung der Intensität des Fluoreszenzphänomens angestrebt wird (Misgeld 1972, Wick et al. 1976). Es existieren sogar bereits Vorschläge zur Automatisierung des gesamten Arbeitsprozesses (Ten Veen u. Feltkamp 1969), so daß auf diesem Gebiet weitere Fortschritte für Standardisierung, Objektivierung und Labor-Praxis zu erwarten sind.

2. Zu den Ergebnissen

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann grundsätzlich der Schluß gezogen werden, daß die Untersuchung mit den beiden unterschiedlichen Antigen-Materialien vergleichbare Resultate liefert. Die unter Punkt IV. aufgeführte Übereinstimmung erscheint mit 96 % bei den Kontrollseren als günstig; auch die mit 88 % bei den Patientenseren

etwas geringere Konkordanz kann unter Berücksichtigung der gegenwärtig verfügbaren Praktiken zur Standardisierung dieses Verfahrens noch als akzeptabel angesehen werden.

Bei Betrachtung der einzelnen Parameter ergeben sich jedoch insgesamt Vorteile für die Testdurchführung mit den BHK-Zellen.

a) Spezifität

Im Hinblick auf die Kontrollseren erweisen sich die BHK-Zellen den HEK als deutlich überlegen, da der Anteil falschpositiver Ergebnisse mit 2 % gegenüber 6 % erheblich geringer ist.

Bei den Patientenseren muß dagegen differenziert werden:

Läßt man die Höhe der positiven Titerstufen außer acht, so zeigen die BHK-Zellen mit $2/44 = 4,5\%$ eine sehr geringe unspezifische Darstellung nicht-rheumatischer Erkrankungen, während die HEK bei $32/44 = 72,7\%$ dieser Patienten ein positives Ergebnis liefern. Bezieht man jedoch die Höhe der Titerstufen in die Überlegungen mit ein, so ergibt die Untersuchung mit BHK-Zellen etwa bei der chron. Polyarthrititis in zwei Fällen uncharakteristisch hohe Titer von 1 : 160 und 1 : 320; dagegen zeigen die HEK hier durchweg die bei dieser Erkrankung zu erwartenden Titer von bis zu 1 : 80. Im Falle der bereits erwähnten Diagnose eines Virusinfektes lieferten im übrigen beide Antigene hohe positive Titer-Stufen von 1 : 160 bzw. 1 : 320. Klinisch war jedoch ein weitergehendes Krankheitsgeschehen als das obengenannte nicht zu begründen.

b) Sensibilität

Die Betrachtung dieses Parameters läßt eine wesent-

lich empfindlichere Darstellung rheumatischer Erkrankungen durch die BHK-Zellen erkennen. Es werden im Gegensatz zu den HEK, die in $3/21 = 14,3 \%$ dieser Fälle ein negatives Ergebnis liefern, sämtliche 21 Patienten mit der Diagnose eines solchen Krankheitsbildes erfaßt. Ähnliches zeigt sich bei Berücksichtigung der Titerhöhe:

Die BHK-Zellen ergeben bei $3/10 = 30 \%$ der L.e.-Patienten einen für diese Kollagenose charakteristischen positiven Titer von mindestens $1 : 160$; ein solcher ist jedoch bei Untersuchung mit HEK nur in einem Fall ($= 10 \%$) nachzuweisen. In die gleiche Richtung weisen die Ergebnisse, wenn man die ARA-Kriterien für die Diagnose eines L.e. zugrundelegt. Grundsätzlich liefern zwar beide Antigen-Materialien keine deutliche Korrelation zwischen der Titerhöhe und diesen Kriterien, jedoch schnitten auch hier die BHK-Zellen etwas besser ab, da sie immerhin noch bei $4/17 = 23,5 \%$ der Patienten mit wenigstens 4 erfüllten Kriterien durch die Titerhöhe einen serologischen Hinweis auf einen L.e. gaben, während die HEK dies nur bei einem ($= 5,9 \%$) taten und bei zwei Patienten sogar ein negatives Ergebnis zeigten. In diesem Zusammenhang sollte allerdings nicht unerwähnt bleiben, daß nach Beobachtung verschiedener Autoren (Häcki et al. 1976, Fries u. Siegel 1973, Elkayam et al. 1977) diese Kriterien - vor allem auf Grund des schubweisen Verlaufes dieser Erkrankung - nicht als absoluter Diagnose-Maßstab angesehen werden können, woraus sich auch die Diskrepanzen zu den hier vorliegenden Diagnosen erklären lassen.

Die höhere Sensibilität der BHK-Zellen wird also offenbar mit einer geringgradigen partiellen Einschränkung der Spezifität (s. unter V., 2 a) im Hinblick auf die Verteilung der Titerstufen erkauft.

3. Schlußfolgerung

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Verwendung von BHK-Zellen als Antigen-Material bei der Durchführung des indirekten Immunfluoreszenz-Tests als empfehlenswert angesehen werden muß. Dieses Substrat verbindet eine im Vergleich zu HEK höhere Sensibilität, Spezifität und bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit einer nicht unbeträchtlichen Verringerung des Arbeitsaufwandes. Besondere Aufmerksamkeit sollte dabei jedoch der Beurteilung von sehr hohen und sehr niedrigen Titerstufen gewidmet werden; auch darf bei diesem Substrat - was prinzipiell für die Bewertung aller isolierten Labor-Parameter zu fordern ist - die Höhe der Titerstufen nicht unkritisch, d. h. ohne Berücksichtigung klinischer Daten, zur Diagnosestellung herangezogen werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung werden Hühner-Erythrozyten-Kerne und gebrauchsfertig präparierte baby-hamster-kidney-Zellen als antigene Substrate des indirekten Immunfluoreszenz-Tests miteinander verglichen. Als Untersuchungsmaterial dienen 65 Seren von Patienten mit verschiedenartigen Erkrankungen und 50 Seren von gesunden Blutspendern. Geprüft wird nach den Kriterien Sensibilität, Spezifität, Reproduzierbarkeit und Praktikabilität.

Dabei wird auch auf die grundsätzliche Bedeutung antinukleärer Faktoren und künftig zu erwartende Fortentwicklungen des indirekten Immunfluoreszenztests eingegangen. Außerdem wird auf die prinzipiellen und methodischen Vorzüge dieses Testes gegenüber anderen gängigen Verfahren zum Nachweis antinukleärer Serumfaktoren abgehoben.

Nach den Ergebnissen erweisen sich die baby-hamster-kidney-Zellen im Vergleich zu den Hühner-Erythrozyten-Kernen als das insgesamt vorteilhaftere Antigenmaterial, da sie höhere Sensibilität, Spezifität und bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Kombination mit einer erheblichen Verringerung des Arbeitsaufwandes offerieren.

VIII. LITERATUR

1. Alarcón-Segovia, D.
Drug-induced lupus syndromes
Mayo Clin. Proc. 44 (1969), 664-681
2. Alarcón-Segovia, D., et al.
Antigenic specificity of chlorpromazine-
induced antinuclear antibodies
Clin. Exp. Immunol. 15 (1973), 543-548
3. Albin, W., G. Wick
Hühnererythrozytenkerne als Dauer-
präparation für den Nachweis antinu-
kleärer Faktoren im indirekten
Immunfluoreszenztest
Wien. Klin. Wochenschr. 84 (1972), 416-417
4. Bartholomew, B. A.
Antinuclear antibody tests as a clinically
selected screening procedure
Am. J. Clin. Pathol. 61 (1974), 495-499
5. Beernink, D. H., J. J. Miller
Anticonvulsant-induced antinuclear antibodies
and lupus-like disease in children
J. Pediatr. 82 (1973), 113-117
6. Beickert, A.
Neuere Untersuchungsergebnisse an anti-
nukleären Faktoren
Dtsch. Gesundheitsw. 27 (1972), 2170-75

7. Berthold, A., et al.
Untersuchung über das Vorkommen von Auto-
Antigen und antinukleären Faktoren bei
der chronisch aggressiven Hepatitis
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78 (1972), 922-926

8. Blomgren, S. E., et al.
Procainamide-induced lupus erythematosus.
Clinical and laboratory observations.
Am. J. Med. 52 (1972), 338-348

9. Cammarata, R. J., G. P. Rodnan, R. H. Fennel
Serum anti-gamma-globulin and ANF in
the aged
J. Amer. med. Ass. 199 (1967), 455-458

10. Chapman, J. C.
Lupus erythematosus latex tests compared
with the immunfluorescence method for
antinuclear factor
Übersetzung aus:
Am. J. Med. Technol., Bd. 42, Nr. 5 (1976), 154-157

11. Cleymaet, J.E., et al.
Indirekt immunfluorescent antinuclear
antibody tests: comparison of sensitivity
and specificity of different substrates
Am. J. Clin. Pathol. 58 (1972), 388-393

12. Cohen, A. S., et al.
Preliminary criteria for the classification
of systemic lupus erythematosus
Bull. Rheum. Dis. 21 (1971), 643-648

13. Cohnen, G.
Arzneimittelinduzierte Lupus-erythematoses-
ähnliche Symptome
Med. Klin. 71 (1976), 789-798

14. Dietrichson, O. et al.
The relevance of serological classification
of chronic hepatitis
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 81 (1973), 519-524

15. Dorsch, C. A., C. G. Gibbs, M. B. Stevens
L. E. Shulman
Significance of nuclear immunfluorescent
patterns
Ann. Rheum. Dis. 28 (1969), 313-319

16. Drazdakova, M.
Beitrag zur Standardisierung der
Bestimmung des Antinuklearfaktors (ANF)
Derm. Mschr. 156 (1970), 635-639

17. Dubois, E. L., et al.
NZB/NZW mice as a model of systemic
lupus erythematosus
JAMA 195 (1966), 285-289

18. Elkayam, U. et al.
Pericardial effusion and mitral valve
involvement in systemic lupus erythe-
matus
Ann. Rheum. Dis. 36 (1977), 349-353

19. Feltkamp, T. E. W., K. Kruyff
Penetration of the antinuclear factor
(A.N.F.) into chicken red cells
Vox Sang. 8 (1963), 302-307

20. Fischer, K., E. Dorżewski
Ein Beitrag zur Immunfluoreszenztechnik
zum Nachweis cellulär fixierter Antikörper
Mschr. Kinderheilk. 113 (1965), 175-176

21. Fries, J. F., R. C. Siegel
Testing the "preliminary criteria
for classification of SLE"
Ann. Rheum. Dis. 32 (1973), 171-177
22. Friou, G. J.
Fluorescent spot test for anti-nuclear
antibodies
Arthritis Rheum. 5 (1962), 407-410
23. Friou, G. J.
Antinuclear antibodies: Diagnostic signifi-
cance and methods
Arthritis Rheum. 10 (1967), 151-159
24. Goldwasser, R. A., C. C. Shepard
Staining of complement and modifications
of fluorescent antibody procedures
J. Immunol. 80 (1958), 122-131
25. Gross, Duri
Die sogenannten Kollagenosen
Folia rheumatologica (Documenta Geigy)
16 (1975), 1-7
26. Häcki, M. A., P. J. Grob
Zur Diagnostik des systemischen Lupus
erythematoses. Ein käuflicher Radioassay-
Kit zur Messung von Antikörpern gegen
doppelsträngige DNS.
Dtsch. med. Wschr. 101 (1976), 13-16
27. Hahn, B. H., et al.
Immune responses to hydralazine and
nuclear antigens in hydralazine-induced
lupus erythematosus
Ann. Intern. Med. 76 (1972), 365-374

28. Harpey, J.-P.
Lupus-like syndroms induced by drugs
Ann. Allergy 33 (1974), 256-261
29. Helmke, K., H.-G. Velcovski, K. Federlin
Klinische und prognostische Bedeutung
antinukleärer Faktoren bei einer
D-Penicillamin-Therapie
Dtsch. med. Wschr. 100 (1975), 2198-2203
30. Howard, E. J., S. M. Brown
Clofibrate-induced antinuclear factor
and lupus-like syndrome
JAMA 226 (1973), 1358-1359
31. Huges, G. R. V
Measurement of DNA-antibodies
A 3-year clinical survey
Ann. Rheum. Dis. 33 (1974), 402-403
32. Husain, M. D., et al.
Antinuclear antibodies:
Clinical significance of titers and
fluorescence patterns
Am. J. Clin. Pathol. 61 (1974), 59-65
33. Jäger L.
Klinische Immunologie und Allergologie
Teil 1:
Immunglobuline, 73-99
Klinisch-immunologische Diagnostik, 181-214
Gustav Fischer Verlag, 1. Aufl. (1976)
34. Misgönd, V.
Antikörper-Nachweis mit Immunfluoreszenzmethoden: Quantifizierung und
Standardisierung
Arch. Dermatol. Forsch. 244 (1972), 291-297

35. Miyawaki, S., R. F. Ritchie
Heterogeneity of antinucleolar antibody
and Ig E antinuclear antibody in patients
with systemic rheumatic diseases
J. Immunol. 113 (1974), 1346-1352
36. Muna, N. M., et al.
Fluorescent antibody technic as a routine
procedure in the diagnosis of lupus
erythematosus using stored tissue culture
cells
Am. J. Clin. Pathol. 45 (1966), 117-121
37. Nolph, K. D., et al.
Antibodies to nuclear antigens in patients
undergoing long-term hemodialysis
Am. J. Med. 10 (1976), Vol. 60, 673-676
38. Pastner, D.
Lupus Erythematoses: Der Beitrag des
Laboratoriums zu Diagnose und Verlaufs-
kontrolle
Med. Lab. 28 (1975), 189-197
39. Perry, H. M. Jr., et al.
Relationship of acetyl transferase
activity to antinuclear antibodies and
toxic symptoms in hypertensive patients
treated with hydralazine
J. Lab. Clin. Med. 76 (1970), 114-125
40. Ritchie, R. F.
The clinical significance of titred
antinuclear antibodies
Arthritis Rheum. 10 (1967), 544-552

41. Rosenthal, M., B. Stojan, W. Müller
Differenzierung der antinukleären Antikörper zur
Verbesserung ihrer diagnostischen Aussagekraft
Dtsch.med.Wschr. 101(1976), 379-384
42. Schur, P.H., et al.
Precipitating antibodies to ribosomes
in the serum of patients with systemic
lupus erythematosus
Immunochemistry 4(1967), 447-453
43. Stojan, B.
A simple immunfluorescence method for
differentiation of ANF between RA and
healthy persons and SLE and scleroderma patients
Ann.Rheum.Dis. 34, 2(1975), 197-198
44. Svec, K.H., B.C. Veit
Age-related antinuclear factors.
Immunologic characteristics and
associated clinical aspects.
Arthritis Rheum. 10 (1967), 509-516
45. Ten Veen, J.H., T.E.W. Feltkamp
Techniques: Formalinized chicken red
cell nuclei as a simple antigen for
standardized antinuclear factor determination
Clin.Exp.Immunol. 5 (1969), 673-678
46. Whittingham, S., et al.
Antinuclear antibody response to procainamide
in man and laboratory animals
Am.Heart J. 84(1972), 228-234
47. Wick, G., S. Baudner, F. Herzog
Immunfluoreszenz, Standardisierung, 65-78
Die Medizinische Verlagsgesellschaft
Marburg/Lahn 1976

48. Widelock, D., et al.

Fluorescent antibody procedure for
lupus erythematosus: comparative use of
nucleated erythrocytes and calf thymus
cells

Am. J. Public Health 51 (1961), 829-835

49. Wiik, A., E. Munthe

Complement-fixing granulocyte-specific
antinuclear factors in neutropenic cases
of rheumatoid arthritis

Immunology 26 (1974), 1127-1134

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Kindler, sei an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die umfassende Betreuung bei der Fertigstellung der Arbeit herzlich gedankt.

Ebenso hat mich Herr Dr. Schoppe, speziell bei der Beurteilung der Präparate wie auch durch weiterführende Anregungen, wesentlich unterstützt.

Des weiteren soll auch die Hilfe von Frau Ertz bei der Klärung labortechnischer Fragen nicht unerwähnt bleiben. Außerdem sei der Firma Behring für das bereitgestellte Antigenmaterial und den zahlreichen Ungenannten, die mir bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials behilflich waren, gedankt.

L e b e n s l a u f

Am 3. November 1954 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Karl und Ursula Kleine in Hagen/Westf. geboren.

Nach der Cuno-Grundschule (1960-1964) besuchte ich von 1964 bis 1973 das Albrecht-Dürer-Gymnasium in Hagen. Im Mai 1973 legte ich dort das Abitur ab.

Im Oktober desselben Jahres nahm ich das Studium der Medizin an der Universität Ulm auf. Nach dort bestandener ärztlicher Vorprüfung im August 1975 setzte ich das Medizinstudium an der Universität Düsseldorf bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt fort. Hier legte ich auch im August 1976 die erste und im August 1978 die zweite ärztliche Prüfung ab.

